

自体内皮祖细胞移植修复兔动脉内皮损伤

肖方毅, 张怀勤, 蔡雪黎, 黄伟剑, 林以诺, 周浩, 杨德业, 林杰, 余华

(温州医学院附属第一医院心内科, 浙江省温州市 325000)

[关键词] 内科学; 内皮祖细胞; 细胞移植; 再内皮化; 兔

[摘要] 目的 观察不同数量的内皮祖细胞移植对内膜球囊损伤血管修复的影响。方法 密度梯度离心法分离兔外周血单个核细胞, 以 EGM-2 培养基培养 7 天, 获得兔外周血内皮祖细胞。分高细胞数量移植组(5×10^5 个细胞)和低细胞数量移植组(2×10^5 个细胞), 将相应数量的内皮祖细胞重悬于 100 mL 生理盐水中移植至兔内膜球囊损伤血管局部, 对照组仅注入 100 mL 生理盐水。同时用 CM-DiI 标记内皮祖细胞移植, 进行细胞示踪。4 周后, 处死动物, 荧光显微镜下观察 CM-DiI 标记细胞的分布, 并测量各组内膜损伤血管再生内皮覆盖率和新生内膜增生程度。结果 荧光显微镜下发现荧光标记的内皮祖细胞分布在血管的中膜层、新生内膜层和内膜表面。内皮祖细胞移植可显著促进内膜损伤血管的再内皮化, 以高细胞数量移植组为著, 同时内皮祖细胞移植也大大减少了新生内膜的形成。结论 内皮祖细胞移植可修复内膜球囊损伤血管, 高细胞数量移植有更显著的效果。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Transplantation of Autologous Endothelial Progenitor Cells for Repair of Injured Vessels in Rabbits

XIAO Fang-Yi, ZHANG Hua-Qin, CAI Xue-Li, HUANG Wei-Jian, LIN Yi-Nuo, ZHOU Hao, YANG De-Ye, LIN Jie, and YU Hua

(Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

[KEY WORDS] Endothelial Progenitor Cell; Cell Transplantation; Reendothelialization; Rabbit

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the impact by delivery of different number of endothelial progenitor cells (EPC) on repair of injured vessels. **Methods** Mononuclear cells (MNC) were isolated from rabbit peripheral blood by density-gradient centrifugation. MNC were cultured in endothelial growth medium for 7 days, yielding EPC. Autologous EPC (5×10^5 cells or 2×10^5 cells in 100 mL saline) or 100 mL saline alone (control) were administered into a rabbit model of balloon carotid injury. Meanwhile the cells were labeled by CM-DiI for cells tracking. Four weeks after transplantation, rabbits were killed. Fluorescence-labeled EPC, endothelial regeneration rate and intimal area/media area (IA/MA) ratio were detected. **Results** Four weeks after transplantation, fluorescence-labeled EPC were detected within the media, neointima and on the luminal surface of injured vessel. Local transplantation of EPC compared with saline administration markedly accelerated endothelialization of denuded vessel, especially in the group of 5×10^5 EPC. Meanwhile EPC treatment significantly reduced neointimal formation. **Conclusions** Delivery of EPC to balloon-injured arteries is associated with accelerated reendothelialization and reduced neointimal formation. More notable effect may turn out when larger number of EPC are delivered.

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)自发现以来一直是干细胞研究的热点之一。近年来, 有研究报道 EPC 移植在修复内膜损伤血管中可发挥重要作用^[1], 提示 EPC 移植在动脉粥样硬化的防治和经皮冠状动脉腔内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)术后预防再狭窄中

的应用前景。本实验拟将体外培养兔外周血 EPC 自体移植至兔右颈总动脉内膜球囊损伤模型, 观察不同数量的 EPC 移植对内膜球囊损伤血管不同程度的修复过程, 从而对 EPC 的移植数量做进一步的探索。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康成年雄性新西兰大白兔 27 只, 体重 2.5~3.0 kg, 由中国科学院上海实验动物中心提供[生产许可证号: SCXK(沪)2003-0003]。每只单笼饲养, 普通饲料喂养。随机分为高细胞数量移植组($n=9$), 低细胞数量移植组($n=9$)和对照组($n=9$)。

[收稿日期] 2007-03-19

[修回日期] 2007-09-28

[基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目(303648); 温州市科技局科研基金资助项目(Y2004A036)

[作者简介] 肖方毅, 硕士, 研究方向为内皮祖细胞移植修复内膜损伤血管的相关研究, E-mail 为 harry686896@sohu.co。通讯作者张怀勤, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的发病机制和治疗, E-mail 为 huaiqingzhang@126.com。杨德业, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为高血压病的分子机制。

1.2 主要试剂和仪器

纤维连接蛋白为 Roche 公司产品。兔淋巴细胞分离液为天津灏洋生物制品公司产品。DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白 (DiI-ac-low density lipoprotein, DiI-ac-LDL) 和亲脂性碳青染料 (CM-DiI) 为 Molecular Probe 公司产品。FITC 标记的荆豆凝集素 (FITC-UEA-1) 为 Sigma 公司产品。培养基 EGM-2[含 EBM-2 基础培养基以及一系列生长因子包括人表皮生长因子 (human epidermal growth factor, hEGF)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、人成纤维生长因子 B (human fibroblast growth factor-B, hFGF-B) 和胰岛素样生长因子 1 (insulin growth factor-1, IGF-1) 等] 为 Cambrex 公司产品。一抗兔抗 CD34 多克隆抗体为武汉博士德生物工程有限公司产品。一抗小鼠抗 flk-1 单克隆抗体及兔抗 VIII 因子多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品。免疫组织化学二抗山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG 及免疫组织化学两步法检测试剂盒为北京中杉金桥生物有限公司产品。基质凝胶 (matrigel) 为 B&D 公司产品。胎牛血清、胰酶、Hank's 液、D-Hank's 和 PBS 等为 GIBCO 公司产品。荧光正立显微镜为 Nikon 公司产品。激光扫描共聚焦显微镜 (LSCM) 为 Olympus 公司产品。PTCA 球囊 (球囊直径 2.5 mm, 长 20 mm) 和压力泵为美国 Medtronic 公司产品。4F 动脉鞘为美国 Cordis 公司产品。

1.3 细胞分离、培养和鉴定

1.3.1 细胞的分离和培养 从兔耳中央动脉抽血 30 mL, 抽血后等量生理盐水回输, 抽了血的兔继续饲养 7 天后, 行右颈总动脉内膜球囊损伤术和自体 EPC 移植。新鲜兔外周血采用密度梯度离心法 (密度为 1.096 的兔淋巴细胞分离液, 离心 25 min) 分离单个核细胞 (mononuclear cells, MNC), 重悬于含 10% 胎牛血清的 EGM-2 培养基中, 接种在预先铺好纤维连接蛋白 ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 的 25 cm^2 底面积的培养瓶里。置 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养 4 天后, 以 PBS 洗去未贴壁细胞, 贴壁细胞继续培养。将培养至第 7 天的细胞消化后重悬于 100 μL 生理盐水中用于移植。对照组兔也抽取 30 mL 的外周血, 等量的生理盐水回输, 血标本废弃。兔饲养 7 天后行右颈总动脉内膜球囊损伤术。

1.3.2 细胞的鉴定 (1) DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-1 双荧光染色鉴定: 将培养第 7 天的细胞与 DiI-ac-LDL (10 mg/L) 37°C 孵育 1 h, PBS 洗 3 次后, 用 2% 多聚甲醛固定细胞 10 min。固定后, 用 PBS 浸洗, 将 FITC-UEA-1 (10 mg/L) 加于上述标本中于 37°C 下

孵育 1 h。在 LSCM 下观察, DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-1 双染色阳性的细胞为正在分化的 EPC。④CD34、flk-1 和 VIII 因子表达的免疫组织化学染色检测: 免疫组织化学染色操作步骤均按免疫组织化学两步法检测试剂盒操作说明书进行。为排除假阳性和假阴性结果, 做免疫组织化学染色的同时设空白对照 (PBS 代替一抗)、阴性对照和阳性对照。④体外血管形成试验: 将 matrigel 凝胶冻融后铺于 96 孔培养板上 (30 μL /孔), 37°C 培养箱中孵育 1 h 成胶。同时消化贴壁细胞, 重悬于 EGM-2 培养液中, 调整细胞数为 2×10^5 个/L, 将细胞接种于 96 孔培养板上 (约 20 000 个/孔), 每 2 小时观察血管腔的形成情况。

1.4 CM-DiI 标记细胞

取低细胞数量移植组和高细胞数量移植组的兔各 3 只, 用 CM-DiI 标记 EPC 后移植, 以观察移植细胞在血管中的分布。将培养第 7 天的细胞消化后重悬于 EGM-2 培养液中, 加入 CM-DiI (1 mg/L), 37°C 孵育 5 min 后, 置 4°C 冰箱 15 min, PBS 洗 3 次后, 计算荧光标记率 (荧光显微镜下随机取 5 个 200 倍视野, 计算荧光标记率), 标记好的细胞重悬于 100 μL 生理盐水中用于细胞移植。

1.5 兔右颈总动脉内膜球囊损伤模型的制备及内皮祖细胞移植

兔以 20% 的氨基甲酸甲酯静脉麻醉联合利多卡因颈部局麻后, 做颈部正中切口, 钝性分离右颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉。耳缘静脉注入肝素钠 (300 U/kg) 5 min 后, 动脉夹阻断颈内动脉血流, 结扎颈外动脉远心端。在近结扎处, 以 Seldingers 法穿刺颈外动脉, 成功后送入 4F 的动脉鞘, 通过动脉鞘将直径为 $2.5 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$ 的 PTCA 球囊置于右颈总动脉。压力泵充气保持球囊压力在 6 atm。反复回拉球囊 3 次, 形成 3 cm 长的内膜损伤血管段。撤出球囊, 动脉夹阻断损伤血管近心端血流, 以生理盐水冲洗损伤血管段后, 局部注入 100 μL 的细胞悬液 (高细胞数量移植组含 5×10^5 个 EPC, 低细胞数量移植组含 2×10^5 个 EPC), 对照组仅注入 100 μL 的生理盐水。结扎颈外动脉近心端。翻转兔子身体促进细胞均匀贴壁。细胞在损伤血管段滞留 30 min 后恢复血流, 逐层缝合切口。手术完闭后给予青霉素肌肉注射预防感染。

1.6 标记细胞的观察

注射过量的氨基甲酸甲酯处死兔子, 取出两侧颈总动脉, 包埋于 OCT 中, 冰冻切片成 5 μm 的片段, 荧光显微镜下观察 CM-DiI 标记的细胞在血管中的分布。

1.7 再生内皮覆盖率的测量

兔处死前,耳缘静脉注入 5% 的伊文思蓝染液 (Evansblue) 5 mL。30 min 后,处死兔子,取出损伤血管段,纵向剪开,平铺,暴露内膜面。数码照像并经计算机 Image ProPlus 图像分析软件计算再生内皮面积与总面积之比,即再生内皮覆盖率。

1.8 新生内膜的测量

损伤血管段以 4% 多聚甲醛固定,脱水,石蜡包埋,间断均匀切片,每段血管随机选取 8 张切片常规 HE 染色,用上述图像分析软件计算新生内膜面积 (内弹力板以内) 与血管中膜面积 (内外弹力板之间) 的比值 (intimal area/media area, IA/MA)。

1.9 统计学分析

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析 (One Way ANOVA)。

2 结果

2.1 动物存活情况

实验结束时兔全部存活,对照组有 1 只兔内膜损伤血管段血栓形成,1 只兔内膜损伤血管段异常内膜显著增生堵塞管腔。移植组未见类似情况。

2.2 细胞的培养和鉴定

通过密度梯度离心法,30 mL 外周血中可获得约 3×10^7 个 MNC。培养 5~6 天,可见贴壁细胞汇聚形成大小不等的细胞簇。培养第 7 天,细胞形态不一,由梭形、圆形和不规则形细胞组成 (图 1A)。培养 7~9 天,可见少量梭形的晚期 EPC 三五成群出

现在早期 EPC 之间。并在培养的第 9~12 天迅速长成集落,细胞呈铺路石样排列 (图 1B),表现为近似成熟内皮细胞的形态特征。晚期 EPC 的增殖能力很强,培养 1 个月可传代 5~7 次 (传代比例为 1:3),细胞数量可达 10^8 级。通过激光扫描共聚焦显微镜鉴定,能摄取 ac-LDL (图 2A)、并与凝集素 UEA-1 结合的细胞 (图 2B) 为正在分化的 EPC,培养第 7 天的细胞 90% 以上为双阳性细胞 (图 2C)。免疫组织化学染色显示,培养第 7 天的细胞表达 CD34 (图 2D)、flk-1 (图 2E) 和 VIII 因子相关抗原,显色部位在胞浆;空白对照和阴性对照呈阴性。将培养第 7 天的细胞消化后接种在 matrigel 凝胶上,仅见少数细胞伸长,未见血管腔样结构的形成;将培养第 14 天的细胞接种在 matrigel 凝胶上,37℃ 培养箱中孵育 6 h 即能形成稳定的血管腔样结构 (图 2F)。

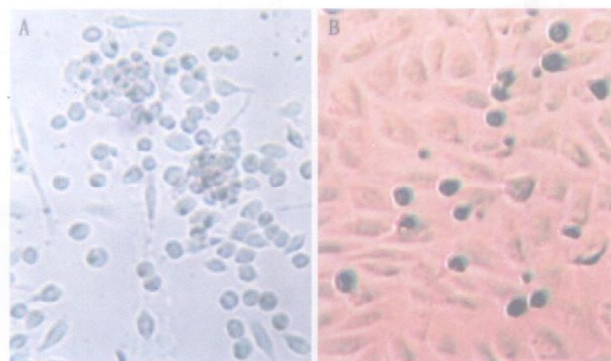


图 1. 培养不同时间的内皮祖细胞的形态及数量变化 ($\times 100$) A 为培养第 7 天的早期内皮祖细胞, B 为培养第 12 天的晚期内皮祖细胞。

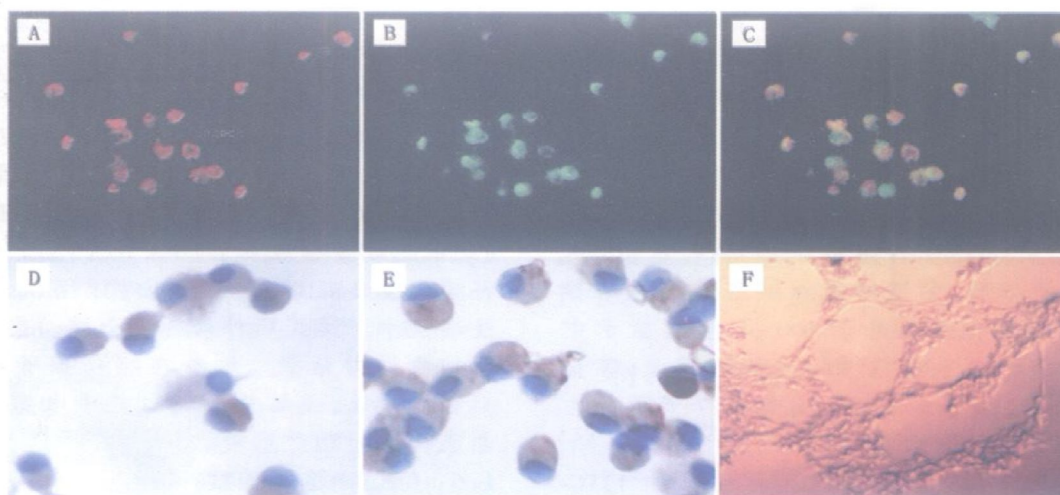


图 2. 不同方法对细胞的鉴定 A、B 和 C 为细胞 DiI-乙酰化低密度脂蛋白和 FITC-UEA-1 双荧光染色结果 ($\times 200$); D (CD34) 和 E (flk-1) 为免疫组织化学染色结果 ($\times 400$); F 为体外血管形成试验结果 ($\times 40$)。

2.3 CM-DiI 标记细胞在血管中的分布

CM-DiI 的标记率为 $96.7\% \pm 0.69\%$ 。术后 4 周, 荧光显微镜下发现, 移植 EPC 的两组兔内膜损伤血管横截面和血管内膜面上均可见发红色荧光的 CM-DiI 标记的细胞。在相应的层面上, 高细胞数量移植组荧光标记细胞数量均多于低细胞数量移植组 (图 3)。在血管横截面上, 可见荧光标记的细胞分布于血管中膜和新生内膜层, 并多数集中于新生内膜与血管中膜的交界附近, 在血管内膜面的荧光标记细胞较少见。对侧未损伤血管未发现荧光标记的细胞。

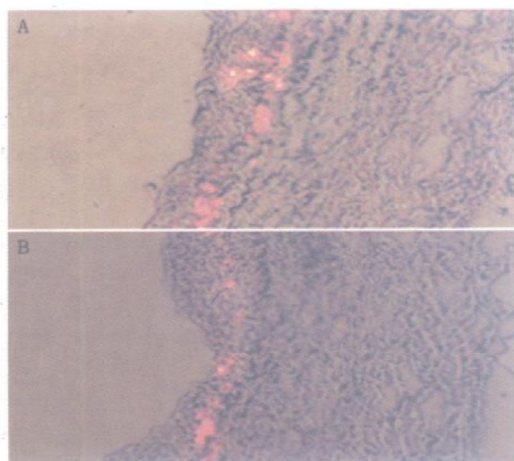


图 3. 术后 4 周 CM-DiI 标记细胞在内膜损伤血管横截面的分布 ($\times 200$) A 为高细胞数量移植组, B 为低细胞数量移植组。

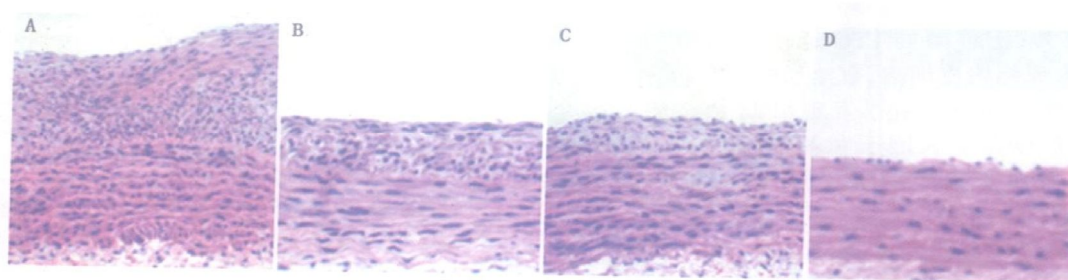


图 5. 术后 4 周各组新生内膜的形成 ($\times 100$) A 为对照组, B 为低细胞数量移植组, C 为高细胞数量移植组, D 为正常血管。

3 讨论

动脉粥样硬化的形成由内皮细胞损伤而始动, 内皮细胞凋亡、巨噬细胞粘附和侵入及平滑肌细胞的迁移和增殖最终引起靶血管狭窄^[3]。加快内膜损伤血管的再内皮化可有效减少平滑肌细胞的增殖和新生内膜的厚度, 因此对动脉粥样硬化早期的预防

2.4 内皮祖细胞移植对内膜球囊损伤血管再内皮化的影响

注入伊文思蓝染液后, 再内皮化的血管腔面不被染色 (即呈白色), 而内膜损伤后尚未再内皮化的血管腔面被染成蓝色。术后 4 周, 伊文思蓝染色发现, 高细胞数量移植组 ($91.6\% \pm 3.6\%$) 和低细胞数量移植组 ($81.7\% \pm 8.6\%$) 的损伤血管段内膜面的白色区域面积均显著大于对照组 ($60.8\% \pm 6.5\%$, $P < 0.01$), 且高细胞数量移植组大于低细胞数量移植组 ($P < 0.05$, 图 4)。

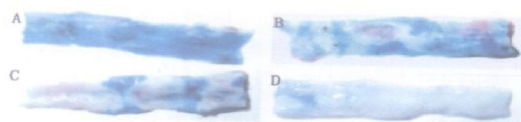


图 4. 伊文思蓝染色观察内皮祖细胞移植对内膜球囊损伤血管再内皮化的影响 A 为球囊损伤后 2 h, B 为球囊损伤后 4 h, C 为低细胞数量移植组, D 为高细胞数量移植组。

2.5 内皮祖细胞移植对内膜球囊损伤血管新生内膜形成的影响

术后 4 周, EPC 移植显著减少新生内膜的厚度, 而对血管中膜和外膜无明显影响 (图 5)。高细胞数量移植组 (0.48 ± 0.11) 和低细胞数量移植组 (0.59 ± 0.11) IA/MA 比值明显低于对照组 (0.90 ± 0.14 , $P < 0.01$), 但两细胞移植组之间差异无显著性 ($P = 0.12$)。

和血管成形术后再狭窄的防治有重要意义。早先学者认为, 在内皮剥脱损伤情况下, 相邻内皮细胞延展而修复损伤, 而现在认为, EPC 同样参与再内皮化过程^[1]。本实验结果证实自体 EPC 经体外培养扩增后移植到体内, 参与了内膜损伤血管的修复, 同时 EPC 的移植数量与内膜损伤血管修复的程度相关。

本实验采用密度梯度离心法从兔外周血中分离MNC,在EGM-2培养基的诱导分化下,培养7天的细胞呈梭形、圆形和不规则形,能摄取 ac-LDL,结合UEA-1,并表达内皮细胞特异性抗原CD34、flk-1和VIII因子相关抗原,符合EPC的特性。培养第7天的早期EPC中少数细胞可分化为具有强克隆增殖能力的呈铺路石样排列的晚期EPC,晚期EPC能在matrigel凝胶上形成稳定的血管腔样结构,具有近似成熟内皮细胞的特性。早期EPC形态不一,不是一个均一同种的细胞群。研究发现其中的大部分细胞为CD14⁺单核细胞来源,因在内皮干细胞专用培养基的诱导分化下,具备了内皮细胞的一些特性,所以既表达单核/巨噬细胞相关抗原,又表达内皮细胞特异性抗原^[4,7]。本实验将培养第7天的早期EPC分高细胞数量移植组和低细胞数量移植组分别移植到兔内膜球囊损伤血管模型,4周后发现,移植的细胞大多分布在血管中膜和新生内膜层,在血管内膜表面的标记细胞并不多见,与Gulati等^[1]报道的结果相似。Gulati等^[1]研究发现这些分布于血管中膜和新生内膜层的细胞仅表达单核/巨噬细胞表面抗原,不表达内皮细胞特异性抗原,而分布于血管内膜表面的细胞则恰恰相反。术后4周,移植EPC的两组兔再生内皮覆盖率均显著高于对照组,以高细胞数量移植组更显著。在新生内膜形成上,高细胞数量移植组和低细胞数量移植组的IA/MA比值显著低于对照组,但移植EPC的两组之间差异无统计学意义,原因可能与样本数量偏少有关。

目前认为,EPC移植修复内膜损伤血管的机制可能主要为:移植的EPC定植到内膜损伤血管段,分化为成熟内皮细胞,直接加速内膜损伤血管段的再内皮化。④有研究^[4]发现早期EPC能分泌包括VEGF、肝细胞生长因子和粒细胞集落刺激因子等在内的促血管生成因子,因而推测移植的早期EPC还可能通过分泌一系列细胞因子,不仅促进周边内皮细胞增殖并迁移至内膜损伤区域,同时也促

进循环血液中的EPC归巢于内膜损伤区域并分化为成熟内皮细胞,促进内膜损伤血管的再内皮化,加速内皮细胞的更新,并部分取代移植的细胞。细胞示踪结果表明,移植4周后最终分布于损伤血管内膜表面起直接再内皮化作用的EPC较少,提示EPC移植可能更多地依赖于分泌细胞因子而发挥修复内膜损伤血管的作用。内膜损伤血管的加速再内皮化可有效减少平滑肌细胞的增殖和迁移,从而一定程度上减少新生内膜的形成。

本研究结果证实外周血EPC经体外培养扩增后,自体移植到内膜球囊损伤血管局部,可加速内膜损伤血管的再内皮化,减少新生内膜的形成。少量(2×10^5 个)的EPC移植即有显著的效果,移植相对大量(5×10^5 个)的EPC,结果更为鼓舞人心。但早期EPC移植有其自身缺陷,包括细胞增殖能力不强、使用于移植的细胞数量受限以及细胞成分不纯等。若用晚期EPC移植可克服上述问题,我们已经开始进行晚期EPC的相关研究。

[参考文献]

- [1] Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Witt TA, Kleppe LS, Mueske CS, et al. Autologous culture-modified mononuclear cells confer vascular protection after arterial injury [J]. *Circulation*, 2003, **108** (12): 1 520-526.
- [2] Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (2): 288-293.
- [3] 宋筱筱,傅国胜. 内皮祖细胞与经皮冠状动脉介入治疗后再内皮化治疗研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (2): 175-178.
- [4] Urbich C, Heschel C, Aicher A, Dembich E, Zeiher AM, Dimmeler S. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells [J]. *Circulation*, 2003, **108** (20): 2 511-516.
- [5] Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors [J]. *Circulation*, 2003, **107** (8): 1 164-169.
- [6] Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, et al. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood [J]. *Circ Res*, 2003, **93** (11): 1 023-025.
- [7] Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells [J]. *Blood*, 2005, **106** (5): 1 525-531.

(此文编辑 许雪梅)